

**Пирог, Т.П. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы / Т. П. Пирог, М.А. Коваленко, Ю. В. Кузьминская // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 348–355.**

УДК 579.841: 577.114

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ИНТЕНСИФИКАЦИИ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ  
*Acinetobacter* sp. НА СМЕСИ ЭТАНОЛА И ГЛЮКОЗЫ**

**Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В.**

*Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук  
Украины, Киев*

Показана возможность интенсификации синтеза микробных экзополисахаридов (ЭПС) при выращивании штамма *Acinetobacter* sp. на смеси двух энергетически-неравноценных субстратов (этанол + глюкоза).

На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза биомассы и ЭПС на энергетически-дефицитном субстрате (глюкоза) определена “дополняющая” концентрация энергетически-избыточного субстрата (этанол), позволяющая восполнить потери углерода глюкозы при окислении ее до CO<sub>2</sub> с целью получения энергии для процессов конструктивного метаболизма, и повысить эффективность конверсии углерода используемых субстратов в ЭПС. Введение этанола в среду с глюкозой в молярном соотношении 3,1:1 позволило увеличить количество синтезированных ЭПС в 1,8-1,9 раза, их выход по отношению к биомассе - в 1,4 - 1,7 раза, выход ЭПС от субстрата – в 1,5 – 2 раза по сравнению с выращиванием продуцента на моносубстратах.

Полученные результаты являются основой для создания новых технологий получения практически ценных вторичных метаболитов при использовании смешанных энергетически-неравноценных ростовых субстратов.

---

**Ключевые слова:** экзополисахариды, энергетически-неравноценные субстраты, смешанные субстраты, энергетические потребности, интенсификация синтеза.

На сегодняшний день, когда биосинтез практически ценных продуктов реализуется в промышленном масштабе, вопросы, касающиеся использования дешевого сырья, обеспечения экономии углеродных субстратов, снижения энергозатрат (АТФ и восстановительных эквивалентов) на процесс микробного синтеза, а также проблемы более полной трансформации углеродных субстратов в практически ценные метаболиты, приобретают особую актуальность. Решение таких задач требует глубоких знаний физиологии, энергетики и биохимии продуцентов. Разработка на основе этих знаний принципов регуляции энергетического и конструктивного метаболизма позволит реализовать биотехнологические процессы с наиболее высокой эффективностью.

В природных местах обитания микроорганизмы, как правило, развиваются в присутствии нескольких углеродных субстратов, в то время, как в лабораторных условиях для их культивирования часто используются моносубстраты в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако известно, что значительная часть некоторых субстратов расходуется на окисление до  $\text{CO}_2$  для получения энергии, необходимой для конструктивного метаболизма (например, при использовании глюкозы до 40%). [1]. Вместе с тем существуют работы, в которых доказана способность микроорганизмов использовать смеси двух (или более) субстратов и прослежены некоторые аспекты регуляции таких процессов [2 – 5]. Однако эти исследования касаются использования смеси субстратов лишь для увеличения выхода биомассы. В литературе отсутствуют данные о возможности получения вторичных метаболитов, в частности, микробных экзополисахаридов (ЭПС), на смеси ростовых субстратов.

По нашему мнению, теоретической основой исследований по увеличению синтеза вторичных метаболитов на смеси нескольких субстратов может служить концепция “вспомогательного” субстрата, предложенная Бабелем [6] для повышения выхода биомассы. В основу концепции положена “энергетическая классификация субстратов”, согласно которой все субстраты делятся на

энергетически-избыточные и энергетически-дефицитные [7]. Центральным углеродным предшественником (ключевым интермедиатом) синтеза всех клеточных компонентов является фосфоглицериновая кислота (ФГК). Если количество АТФ и восстановительных эквивалентов, образуемых на пути от субстрата к ФГК, достаточно для синтеза биомассы, такой субстрат классифицируется как энергетически-избыточный. Энергетически-дефицитными являются субстраты, часть которых должна быть окислена до  $\text{CO}_2$  для получения энергии, необходимой для синтеза клеточных компонентов. Зная метаболические пути превращения углеродного субстрата в ключевой интермедиат синтеза биомассы (ФГК) можно определить “энергетическую ценность” субстрата.

Показано, что комбинация энергетически-неравноценных субстратов (введение вспомогательного энергетически-избыточного субстрата в среду с энергетически-дефицитным субстратом) позволяет: (i) избежать непродуктивных потерь углерода и энергии, которые имеют место при использовании моносубстрата, (ii) повысить эффективность трансформации субстратов в биомассу [2 - 7]. На наш взгляд, такой подход может быть применен не только для повышения выхода биомассы, но и для интенсификации синтеза микробных ЭПС (с учетом дополнительных энергозатрат на их образование). Проверка этого предположения определила основную цель настоящего исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследований.** Объектом исследований являлся штамм *Acinetobacter sp.* 12S – продуцент комплексного полисахаридного препарата этаполана [8, 9]. Этаполан состоит из двух кислых ЭПС, один из которых ацилирован. Ацилированный (АП) и неацилированный (НАП) полисахариды идентичны по молярному соотношению D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы, L-рамнозы, D-глюкуроновой и пировиноградной (ПВК) кислот (3:2:1:1:1:1) и структуре повторяющегося звена углеводной цепи. Различие между этими ЭПС состоит в том, что ацилированный полисахарид содержит жирные кислоты ( $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{18}$ ): лауриновую, пальмитиновую, пальмитолеиновую, стеариновую и

олеиновую. Реологические свойства растворов этаполана, определяющие его практическую значимость, зависят от соотношения в его составе АП и НАП, а также содержания жирных кислот в АП. В различных условиях культивирования продуцента содержание АП в составе этаполана составляет 10-90% [9].

**Культивирование *Acinetobacter sp.* 12S.** Бактерии выращивали на жидкой минеральной среде Кодама [10], в которую дополнительно вносили 0,5% (по объему) дрожжевого автолизата и 0,0006% пантотената кальция. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 1,0 и 1,5% (по объему), глюкозу в концентрации 1,0 и 1,5% (масс.), а также смесь этих субстратов в соотношении 1:2; 1:1; 2:1 (% этанола по объему : масс. % глюкозы). При выращивании бактерий на смешанном субстрате концентрация этанола составляла 0,5 и 0,75% (по объему), глюкозы - 0,5 и 0,75% (масс.).

Бактерии *Acinetobacter sp.* выращивали в колбах на качалке (220 об/мин) при 30°C, pH 6,8-7,0 в течение 96 ч. В качестве посевного материала использовали суточную культуру, выращенную на мясо-пептонном агаре (МПА).

Концентрацию биомассы определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес клеток по калибровочному графику. Количество синтезированных ЭПС устанавливали весовым методом [11]. Выход ЭПС от субстрата определяли, как описано в работе [12]. ЭПС-синтезирующую способность определяли как отношение количества синтезированных ЭПС к биомассе и выражали в г ЭПС/г биомассы.

Концентрацию этанола определяли методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе «Цвет-4» с пламенно ионизационным детектором (колонка 2 м, твердый носитель целит-545, неподвижная жидкая фаза полиэтиленгликоль ПЭГ-400 (20%), газ-носитель - гелий, температура 150°C). Концентрацию глюкозы в культуральной жидкости определяли глюкозооксидазным методом [13].

**Определение энергетических затрат на синтез биомассы и ЭПС.** Расчет энергетических затрат на образование биомассы проводили, как описано в работе [7]. Определение энергетических потребностей синтеза ЭПС осуществляли, как

описано в работе [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Расчет соотношения концентраций этанола и глюкозы при выращивании *Acinetobacter sp. 12S* на их смеси.** Ранее было показано, что окисление этанола и ацетальдегида у *Acinetobacter sp.* катализируется НАД<sup>+</sup>- и НАДФ<sup>+</sup>-зависимыми ферментами [15]; катаболизм глюкозы осуществляется по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (гликолиз) и Энтнера-Дудорова (КДФГ-путь) [16]. Согласно “энергетической” классификации субстратов Бабея [7] этанол является энергетически-избыточным, а глюкоза – энергетически-дефицитным субстратом.

Для установления соотношения концентраций этанола и глюкозы в среде культивирования было необходимо:

- рассчитать энергетические потребности синтеза биомассы и ЭПС на энергетически-дефицитном субстрате;
- определить концентрацию энергетически-избыточного субстрата, восполняющую потери углерода энергетически-дефицитного субстрата при окислении его до CO<sub>2</sub> с целью получения энергии, необходимой для процессов конструктивного метаболизма.

Для проведения таких расчетов необходимо знать пути метаболизма этанола и глюкозы у бактерий *Acinetobacter sp. 12S*, структуру повторяющегося звена углеводной цепи ЭПС (в дальнейшем при изложении материала – “звено ЭПС”), а также соотношение Р/О.

При расчете оптимального соотношения концентраций этанола и глюкозы при росте *Acinetobacter sp. 12S* на их смеси нами были приняты следующие допущения:

- этанол преимущественно используется в качестве источника энергии, на синтез биомассы и ЭПС расходуется углерод глюкозы;
- 50% глюкозы катаболизируется по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и 50% - по пути Энтнера-Дудорова;

- соотношение P/O равно 2;
- ЭПС содержит 50% АП и 50% НАП;
- в составе повторяющегося звена АП содержится два остатка жирных кислот. Данное допущение обусловлено тем, что при установлении структуры повторяющегося звена углеводной цепи АП точное место О-ацилирования установить не удалось [9]. Однако устойчивость глюкозы и галактозы при деградации по Смитсу позволила предположить, что по крайней мере, эти два моносахаридных остатка ацилированы. При расчетах допускали, что в составе звена АП содержится остаток лауриновой ( $C_{12}H_{24}O_2$ ) и пальмитиновой ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) кислот;
- НАДФН, образующийся при катаболизме этанола и глюкозы, является источником восстановительных эквивалентов, которые окисляются до воды через дыхательную цепь.

***Потребность в АТФ для синтеза этанола из глюкозы.*** Несмотря на достаточно интенсивные исследования в области микробных ЭПС, изучению энергетических потребностей их синтеза посвящено не так много работ. Так, исследована энергетика синтеза альгината [17], ксантана [14], ЭПС, синтезируемых на основе метанола [18].

На рис. 1 и 2 представлены предполагаемые (по аналогии с предложенной в работе [14] схемой синтеза ксантана) схемы синтеза повторяющегося звена ацилированного полисахарида при гликолитическом и КДФГ-пути катаболизма глюкозы у *Acinetobacter sp.* АТФ расходуется на синтез моносахаридов и жирных кислот, входящих в состав звена АП.

1. ***Затраты энергии на синтез моносахаридов.*** Как следует из приведенных схем (рис. 1 и 2), один моль АТФ (или ее эквивалента) используется при образовании глюкозо-6-фосфата и один – при образовании нуклеозиддифосфатсахаридов (например, глюкозо-1-фосфат → УДФ-глюкоза или маннозо-1-фосфат → ГДФ-манноза и т.д.). Кроме того, одна макроэргическая связь расходуется для присоединения повторяющегося звена к молекуле ЭПС (т.е. при полимеризации ЭПС) [14]. В состав звена АП входят

остатки семи нейтральных моносахаридов и остаток глюкуроновой кислоты. Для их синтеза необходимо 8 молей глюкозы. Энергозатраты на синтез из глюкозы одного моносахарида, входящего в состав звена АП, составляют 2 моля АТФ. Общий расход АТФ на синтез моносахаридов, входящих в состав повторяющегося звена АП, и присоединение этого звена к молекуле ЭПС составляет  $8 \times 2 + 1 = 17$  молей АТФ (как при гликолитическом, так и при КДФГ-пути катаболизма глюкозы).

2. *Затраты энергии на синтез жирных кислот из ацетил-КоА.* Синтез жирных кислот осуществляется следующим образом [1]: из ацетил-КоА и  $\text{CO}_2$  посредством АТФ-зависимой реакции образуется малонил-КоА и далее в результате трех последующих реакций образуется бутирил-КоА. Образовавшийся бутирил-КоА взаимодействует со следующей молекулой малонил-КоА, и процесс повторяется до образования  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CO-SКоА}$ . В следующем цикле в качестве конечного продукта образуется  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{CO-SКоА}$ . Таким образом, путем последовательного наращивания ацил-КоА на двууглеродный фрагмент (посредством взаимодействия с малонил-КоА и последующей потери  $\text{CO}_2$ ) синтезируются высшие жирные кислоты в виде соответствующих ацил-КоА. Следовательно, для синтеза лауриновой кислоты ( $\text{C}_{12}$ ) необходимо 5 циклов, для образования пальмитиновой ( $\text{C}_{16}$ ) – 7 циклов. В одном цикле расходуется 1 моль АТФ. Таким образом, энергозатраты на синтез жирных кислот, входящих в состав повторяющегося звена АП, составят  $5 + 7 = 12$  моль АТФ (как при гликолитическом, так и при КДФГ-пути катаболизма глюкозы).

*Генерация энергии при синтезе этанола из глюкозы.* Энергия генерируется при синтезе ПВК, глюкуроновой кислоты и ацетил-КоА (предшественника жирных кислот).

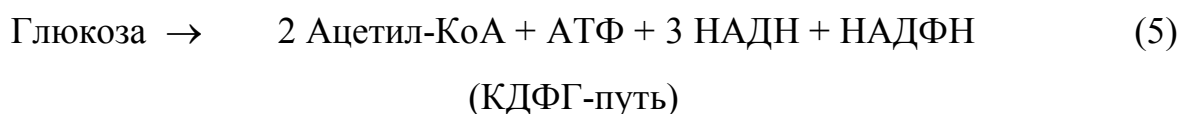
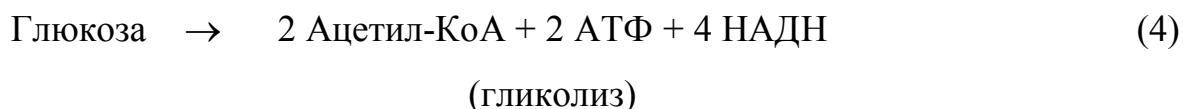
1. *Синтез ПВК.* Суммарную реакцию образования ПВК из глюкозы можно представить в виде следующих уравнений:



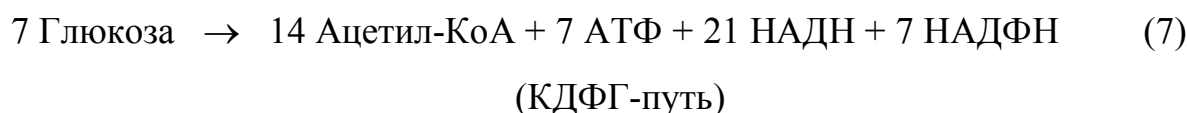
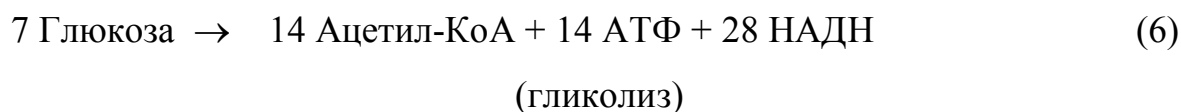
2. *Образование глюкуроновой кислоты.* При окислении глюкозы до глюкуроновой кислоты (в повторяющемся звене ЭПС содержится 1 моль глюкуроновой кислоты) образуется 2 НАД(Ф)Н:



3. *Синтез ацетил-КоА.* Суммарную реакцию образования ацетил-КоА из глюкозы можно представить в виде следующих уравнений:



Для синтеза моля лауриновой кислоты необходимо 6, а для образования моля пальмитиновой кислоты – 8 молей ацетил-КоА. Всего необходимо 14 молей ацетил-КоА, для образования которых расходуется 7 молей глюкозы. Генерация энергии при этом составит:



Приведенные выше данные по затратам АТФ на синтез звена АП и НАП, а также данные по генерации энергии (уравнения 1-7) можно представить в виде таблицы (табл.1).

На образование повторяющегося звена АП расходуется 15,5 молей глюкозы (8 молей на синтез моносахаридов и глюкуроновой кислоты; 0,5 моля – на образование ПВК и 7 молей на образование жирных кислот), на синтез звена НАП расходуется 8,5 молей глюкозы (8 молей на синтез моносахаридов и глюкуроновой кислоты; 0,5 моля – на образование ПВК). Энергетические потребности микробного синтеза АП и НАП в пересчете на моль использованной глюкозы представлены в табл. 2. Таким образом, генерация энергии при синтезе повторяющегося звена АП и звена НАП (АП + НАП) составляет:

$$3,5 - 1,92 = 1,58 \text{ моль АТФ/моль использованной глюкозы (гликолиз);}$$

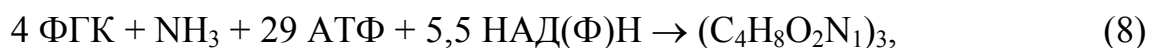
$3,17 - 1,92 = 1,25$  моль АТФ/моль использованной глюкозы (КДФГ-путь).

Согласно нашему допущению, 50% глюкозы катаболизируется по гликолитическому, а 50% - по КДФГ-пути. Следовательно, генерация энергии при синтезе ЭПС из глюкозы составляет 1,42 моль АТФ/моль использованной глюкозы.

Приведенные результаты, как и данные, изложенные в работе [14], свидетельствуют о том, что чем выше содержание окисленных заместителей (уроновых кислот, пирувата, жирных кислот, ацетата, сукцината и др.) в составе ЭПС, тем больше энергии генерируется при синтезе таких полисахаридов. При синтезе нейтральных ЭПС (например, курдлана) генерации энергии не происходит.

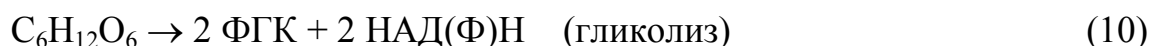
**Энергетические затраты при синтезе биомассы.** Энергетические затраты на синтез биомассы отражает экономический коэффициент расхода АТФ ( $Y_{\text{АТФ}}$ ):  $Y_{\text{АТФ}} = \Delta x / \Delta \text{АТФ}$ , где  $\Delta x$  – количество биомассы (г), синтезированной при затрате энергии 1 моль АТФ ( $\Delta \text{АТФ}$ ). Установлено, что для большинства микроорганизмов при синтезе биомассы из ФГК  $Y_{\text{АТФ}}$  одинаков и составляет около 10,5 г клеток/моль АТФ [19].

Синтез биомассы из ФГК (при использовании аммонийного источника азота) можно представить в виде уравнения [7]:



где  $(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_1)_3$  – формула биомассы.

Суммарные реакции превращения этанола и глюкозы в ФГК выражаются следующими уравнениями [7] :



Принимая во внимание допущение о том, что 50% глюкозы катаболизируется по гликолитическому, а 50% - по КДФГ-пути, уравнения 10 и 11 можно объединить:



Для Р/О, равного 2, уравнения 9 и 12 можно представить в виде:



Исходя из уравнения синтеза биомассы из ФГК (уравнение 8) и уравнения катаболизма глюкозы до ФГК (уравнение 14) можно рассчитать, что при росте на глюкозе потребность в АТФ для синтеза биомассы (в расчете на моль глюкозы) составляет 17 молей. Мы считаем, что эта энергия может быть получена из этанола. Учитывая, что при синтезе ЭПС из глюкозы генерируется 1,42 моль АТФ/моль использованной глюкозы, за счет этанола должно быть получено  $17 - 1,42 = 15,58$  моль АТФ. Из уравнения 13 следует, что для получения такого количества АТФ необходимо 3,12 моль этанола. Следовательно, молярное соотношение этанола и глюкозы в среде должно составлять 3,12:1. Например, при концентрации глюкозы в среде 1 масс.% (10 г/л, или 0,056 молей) концентрация этанола должна составлять 0,175 молей, или 8,04 г, или 1% (по объему). Таким образом, соотношение глюкозы (масс.%) и этанола (% по объему) в среде культивирования должно составлять 1:1.

***Синтез этаполана при выращивании Acinetobacter sp. 12S на смеси этанола и глюкозы.*** В табл.3 представлены данные по образованию этаполана на смешанном субстрате при различном соотношении этанола и глюкозы. При культивировании продуцента на смеси субстратов количество синтезированных ЭПС было выше, чем на моносубстратах. Однако при соотношении концентраций этанола и глюкозы, равном 2:1, содержание ЭПС практически не отличалось от такового на моносубстратах. Кроме того, при соотношении концентраций этанола и глюкозы 2:1 и 1:2 ЭПС-синтезирующая способность и выход ЭПС от субстрата существенно не отличались от полученных при выращивании продуцента на моносубстратах. Только при теоретически рассчитанном соотношении концентраций этих субстратов, равном 1:1, наблюдалось существенное увеличение не только количества синтезированных ЭПС, но и их выхода по отношению к биомассе и субстрату. При культивировании бактерий на смешанном субстрате оба субстрата потреблялись одновременно (рис. 3).

При выращивании *Acinetobacter sp.* 12S на смеси этанола и глюкозы в соотношении 1:1 наблюдали не только увеличение показателей, представленных в табл. 3. В таких условиях отмечали также интенсификацию роста бактерий и синтеза ими ЭПС. Так, через 24 ч культивирования содержание биомассы и ЭПС на смешанном субстрате было в два, а вязкость культуральной жидкости – в 4-5 раз выше, чем на моносубстратах (табл. 4).

Таким образом, в результате проведенных исследований впервые показана возможность интенсификации синтеза вторичных метаболитов (микробных ЭПС) на смеси энергетически-неравноценных субстратов. Полученные результаты являются основой для разработки новых биотехнологий получения практически ценных вторичных метаболитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. 310 с.
2. Van Verseveld H.W., Boon J.P., Stouthamer A.H. Growth yield and the efficiency of oxidative phosphorylation of *Paracoccus denitrificans* during two-(carbon)substrate – limited growth // Arch. Microbiol. 1979. 121. P. 213-223.
3. Linton J.D., Griffiths K., Gregory M. The effect of mixtures of glucose and formate on the yield and respiration of a chemostat culture of *Beneckea natriegens* // Arch. Microbiol. 1981. 129. P. 119-122.
4. Eggeling L., Sahm H. Enhanced utilization-rate of methanol during growth on a mixed substrate: a continuous culture study with *Hansenula polymorpha* // Arch. Microbiol. 1981. 130. P. 362-365.
5. Muller R.H., Markuske K.D., Babel W. Verbesserung der Y-Werte bei Wachstum von *Hansenula polymorpha* auf Methanol durch simultane Verwertung von Glucose // Z. Allg. Mikrobiol. 1983. 23. P. 375-384.
6. Babel W. Bewertung von Substraten für das mikrobielle Wachstum auf der Grundlage ihres Kohlenstoff/Energie-Verhältnisses // Z. Allg. Mikrobiol. 1979. 19. P. 671-677.
7. Babel W., Muller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: Biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. 1985. 131, N 1. P. 39-45.
8. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-соединениях. Киев: Наук. думка, 1992. 212 с.
9. Пирог Т.П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* Дисс..... докт. биол. наук. Киев, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1999. 450 с.
10. Кодама Т., Накахара Т., Омори Т., Бинх Н.Т., Хошино К., Минода И. Образование внеклеточных полисахаридов водородными и метаниспользующими

микроорганизмами // Рост микроорганизмов на C<sub>1</sub>-соединениях: Тез. докл. симп. (12-16 сентября 1977, г. Пущино). Пущино: НЦБИ АН СССР. 1977. С. 213-215.

11. *Williams A.G., Wimpenny W.T.* Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture // *J. Gen. Microbiol.* 1978. 104. P. 47 – 57.

12. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М: Мир, 1978. 331 с.

13. *Лукомская И.С., Городецкий В.К.* Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы крови в норме и при диабете // *Биохимия.* 1961. 26, № 3. С. 477-482.

14. *Jarman T.R., Pace G.W.* Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis // *Arch. Microbiol.* 1984. 137. P. 231-235.

15. *Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р.* Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter sp.*, не образующего экзополисахариды // *Микробиология.* 2001. 70, № 6. С.

16. *Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В.* Образование экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter sp.* и особенности его C<sub>6</sub>-метаболизма // *Микробиология.* 2002. 71, № 2. С.

17. *Mian F., Jarman T.R., Righelato R.C.* Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* 1978. 134. P. 418-422.

18. *Linton J.D., Watts P.D., Austin R.M., Haugh D.E., Niekus H.G.D.* The energetics and kinetics of extracellular polysaccharide production from methanol by microorganisms possessing different pathways of C<sub>1</sub> assimilation // *J. Gen. Microbiol.* 1986. 132. P. 779-788.

19. *Stouthamer A.H., Bettenhausen C.* Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch culture of microorganisms // *Biochimica et biophysica acta.* 1973. 301. P. 53-70.